

University of Groningen

## Mechanisms of bacterial selection in the mycosphere of tricholomataceous fungi

Boersma, Feiko Geurt Hidde

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2010

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Boersma, F. G. H. (2010). *Mechanisms of bacterial selection in the mycosphere of tricholomataceous fungi*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## Nederlandse samenvatting

Bijna alle planten en bomen op aarde zijn voor hun groei afhankelijk van bepaalde schimmels in de bodem. Deze zogenaamde mycorrhizaschimmels gaan een samenwerking, een symbiose, aan met de plant of boom door zich om en in de wortels te nestelen. Daar helpen ze de plant met het opnemen van water en voedingsstoffen, zoals fosfor en kalium. De draden van de schimmels, die hyfen worden genoemd, groeien snel en bereiken delen van de bodem waar een wortel niet kan komen. Het opnameoppervlakte van de plant wordt zo via de schimmel vele malen vergroot. Opname van water en voedingsstoffen is daardoor stukken efficiënter. De schimmel transporteert de stoffen die het diep in de bodem heeft opgenomen vervolgens naar de plantenwortel toe. Als tegenprestatie levert de plant voedsel in de vorm van fotosyntheseproducten aan de schimmel. Het is dus een win-win situatie: beide partners worden er beter van.

In de nazomer of de herfst vormen de hyfen paddestoelen boven de grond om zich zo over een breder gebied te verspreiden. Sporen die zich onder aan de paddestoelhoed bevinden, waaien met de wind mee naar andere plaatsten. Bekende mycorrhiza-paddestoelen in de Nederlandse bossen zijn de vliegenzwam, de cantharel en het eekhoorntjesbrood.

In de grond onder die paddenstoelen bevinden zich dikke kluwen hyfen van waaruit de paddenstoel is ontstaan, de paddenstoelvoet. Die hyfenkluwen zijn een belangrijke bron van voedsel voor het nog kleinere leven in de bodem, vooral voor bacteriën. Dode hyfen lekken hoge concentraties koolstofbronnen, terwijl levende hyfen actief allerlei voedingsstoffen uitscheiden. Voor bacteriën is dat voedsel erg welkom; normaal is grond namelijk behoorlijk voedselarm. Veel bacteriën verdubbelen zich weken tot maanden nauwelijks, totdat de mogelijkheid van voedselopname zich aandient, vaak in de vorm van een plantenwortel of een hyfenstelsel.

Over de bacteriën die reageren op het voedsel dat vrijkomt vanuit een plantenwortel is in de wetenschappelijke literatuur al veel te vinden. Er zijn bovendien legio symbioses opgehelderd waarmee de bacteriën wat terugdoen voor het voedsel dat ze krijgen. Zo vormen sommige bacteriesoorten zogenaamde wortelknolletjes waarmee ze stikstof

vastleggen voor de plant. Ook zijn er bacteriën gevonden die stoffen uitscheiden die de groei van plantenwortels stimuleren of die de symbiose tussen wortel en mycorrhiza verbeteren.

Over de bacteriën die profiteren van het vrijkomende voedsel onder de paddenstoel is echter nog maar weinig bekend, alhoewel de verwachting is dat ze, net als hun familieleden bij planten, belangrijk zijn voor de schimmel en zelfs voor de schimmel-plant interactie. Daarmee is kennis over de bacteriën uiteindelijk van belang voor onder andere landbouw- en natuurbeleid.

In dit proefschrift wordt daarom een verkennende studie gedaan naar welke bacteriën specifiek geselecteerd worden door mycorrhizaschimmels. Het onderzoek focust zich op twee soorten mycorrhiza's: de schubbe popzwam (*Laccaria proxima*) en de verblekende russula (*Russula exalbicans*): Welke bacteriën worden specifiek gevonden onder deze schimmels en welke mechanismen zorgen ervoor dat ze zo succesvol zijn?

Om hierachter te komen maken we gebruik van moderne moleculaire technieken. Minder dan 1 procent van alle bacteriën uit de bodem laten zich maar groeien op een voedingsbodem in het laboratorium. De rest – de niet-cultiveerbaren – heeft te specifieke groeiomstandigheden en voedingsstoffen nodig, waarvan we niet weten hoe we die in het laboratorium voor elkaar krijgen. Daarom gebruiken we technieken die gebaseerd zijn op totale DNA-isolatie en -analyse om toch een snapshot te krijgen van wat er leeft in de bodem. Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van deze zogenaamde moleculaire technieken en hoe ze kunnen worden ingezet in de mycosphere, de grond die onder invloed staat van de hyfen.

Zo'n analyse begint met het isoleren van DNA uit de grond. Als het om de mycosphere gaat, wordt de losse aarde van de hyfenbundel geschud, waarnaar er enkele hyfen worden gebruikt om DNA uit te isoleren. Daarna volgt een methode die specifiek herkenbare gedeeltes van al het bacterie-DNA kopieert, de zogenaamde PCR-reactie. Vervolgens zijn er verschillende methoden om alle stukken DNA, die van verschillende bacteriën afkomstig, van elkaar te scheiden om zo daadwerkelijk inzicht te krijgen in welke bacteriën er in dat specifieke stuk grond leven. In dit proefschrift wordt vooral gebruikt gemaakt van DGGE, een methode die het DNA scheidt op basis van hun basepaarsamenstelling. Ook worden er *clone libraries* gemaakt, waarbij de daadwerkelijke basepaarvolgorde van specifieke stukken DNA

wordt bepaald. Aan de hand daarvan kunnen we zien welke soorten bacteriën in ons monster zitten.

In het eerste experimentele hoofdstuk, hoofdstuk 3, worden beide methoden ingezet om te onderzoeken of bacteriën van de soort *Sphingomonadaceae* geselecteerd zijn in de mycosphere van de 2 eerder genoemde mycorrhizaschimmels. Uit een verkennende studie op voedingsbodems in het laboratorium bleek dat *Sphingomonadaceae* belangrijke spelers in de mycosphere waren. Met moleculaire methoden tonen wij in deze studie aan dat het effect ook in de niet-cultiveerbare fractie aanwezig was. Het bleek dat het zogenaamde mycosphere-effect het sterkste was bij de verblekende russula. Verrassend was dat bij drie op verschillende plaatsen gevonden russula's dezelfde *Sphingomonadaceae* werden aangetroffen. Zelfs als de bacteriepopulatie van de omringende grond danig van elkaar verschilde, bleek de verblekende russula dezelfde bacteriën te selecteren. Ook bij de geschubde fopzwam was er sprake van selectie, al was het verschil met de omliggende grond minder groot dan bij de russula. Wel was ook hier zichtbaar dat dezelfde soort schimmel dezelfde bacteriën selecteert: de twee onderzochte fopzwammen hadden nagenoeg hetzelfde bacterieprofiel.

Een andere verrassende vondst was dat de profielen van de russula en de fopzwam geenszins met elkaar in overeenstemming waren. Daaruit blijkt dat elke schimmel zijn eigen favoriete bacteriën om zich heen verzamelt. Het mechanisme achter die specifieke selectie blijft nog onbekend.

Verder bleek dat veel van de *Sphingomonadaceae*-soorten die gevonden werden weinig overeenkomsten hadden met al eerder gevonden familieleden. Dat geeft nog maar eens weer dat de mycosfeer een omgeving is waar de wetenschappelijke wereld pas net zijn interesse voor toont en waar nog veel valt te ontdekken.

De rest van het onderzoek in dit proefschrift richtte zich op een andere bacteriesoort die ook geselecteerd is in de mycosphere van de geschubde fopzwam: *Variovorax paradoxus*. Zowel in 2004 als in 2006 bleek deze bacterie zo'n 10 procent uit te maken van de totale cultiveerbare fractie. Dat betekent dat deze bacterie een winnende strategie heeft gevonden om zich razendsnel aan te kunnen passen aan de nieuwe ecologische mogelijkheden die het ontstaan van een paddestoel met zich meebrengt.

Hoofdstuk 4 beschrijft een van de mechanismen achter de winnende strategie.

Experimenten in het laboratorium met een familielid van de geschubde fopzwam, *Lyophyllum* sp. stam Karsten, lieten zien dat *Variovorax paradoxus* erg goed groeit op de koolstofbron glycerol dat de schimmel uitscheidt. Nadat we de schimmel voor een paar weken hadden gegroeid in een vloeibaar groeimedium, bleek uit NMR-analyse dat glycerol een van de belangrijkste uitgescheiden of geëkte producten was van *Lyophyllum* Karsten. Als we vervolgens de bacteriën aan het medium toevoegden, bleek de glycerol te verdwijnen, terwijl de concentratie bacteriën exponentieel toenam. Ook toen we bacteriën aantetten in grond, bleek toevoeging van glycerol een positief effect te hebben op de groei van de bacteriën.

Daarmee waren we er echter nog niet. Geheel tegen de verwachting in bleek namelijk dat *Variovorax paradoxus* is zijn geheel niet in staat was om te overleven in de grond waarin deze soort was gevonden. Dat bleek te maken te hebben met de lage pH van de grond. *Variovorax paradoxus* kan niet onder een pH van 5,0 leven, terwijl de grond een pH heeft van 4,5.

Sommige schimmels zijn echter in staat om de pH verhogen, en het bleek dat *Lyophyllum* Karsten daar ook tot in staat was. Aangeent in een medium met pH van ongeveer 4,0, bleek 2 weken later dat de pH was gestegen tot ongeveer 6,5, ideale omstandigheden voor de bacterie. Ook als de schimmel aangeent werd in de grond bleek het neutraliserend effect op te treden. Het effect was daar wel minder sterk, waarschijnlijk door het 'verduinnende' effect van de bodem: de neutraliserende stoffen die de schimmel uitscheidt reiken niet zo ver in de grond.

Om aan te tonen dat *Variovorax paradoxus* daadwerkelijk reageerde op de verhoging van de pH, werd de bacterie aangeent in geneutraliseerde grond. Uit de experimenten bleek - zoals verwacht - dat *Variovorax paradoxus* goed groeide in grond met een neutralere pH. *Variovorax paradoxus* heeft dus een duidelijk voordeel van het pH-neutraliserende effect van *Lyophyllum* Karsten

Het onderzoek in beide hoofdstukken laat dus zien dat de winnende strategie van *Variovorax paradoxus* niet gebaseerd is op één typische eigenschap. Juist de combinatie van factoren

maakt dat deze bacterie zo succesvol is. Dit geeft aan dat selectie in de mycosphere een complex fenomeen is.

Het laatste experimentele hoofdstuk, hoofdstuk 6, richt zich op de eventuele genetische achtergrond die maakt dat de *Variovorax paradoxus* stam, HB44, zich snel kan aanpassen aan een opkomende schimmel. De bacterie blijkt een klein stuk dynamisch DNA te hebben, een zogenaamd plasmide, een element dat zich snel tussen bacteriën verplaatst en deels verantwoordelijk is voor de genetische plasticiteit waar bacteriën bekend om staan. Dit plasmide, pHB44 gedoopt, is het eerste plasmide dat geïsoleerd is uit de mycosfeer.

Het plasmide in deze *Variovorax paradoxus* blijkt ongeveer 55.000 basenparen groot te zijn. Een groot gedeelte daarvan omvat de genen die betrokken zijn bij stabilisatie, onderhoud en de verspreiding van het element. Deze ruggegraatgenen zijn al veelvuldig beschreven in de wetenschappelijke literatuur en worden gevonden op vele plasmiden uit verschillende omgevingen.

Interessanter zijn de genen die tussen de ruggengraat liggen. Een moleculaire analyse liet zien dat er ongeveer 12.000 basenparen aan genen op het plasmide ligt die mogelijk te maken heeft met het succes van de bacterie in de mycosphere.

Tot dusver is maar een klein gedeelte van de DNA-volgorde van deze 12.000 basenparen opgehelderd. Een eerste analyse duidt erop dat de genen die het bevat mogelijk een rol hebben in het opnemen van ijzer en bepaalde koolwaterstoffen. Een meer diepgaande analyse is nu aan de gang en moet meer informatie opleveren over de rol van het plasmide in het succes van *Variovorax paradoxus* in de mycosphere.

Samenvattend geeft het onderzoek in dit proefschrift inzicht in de complexe interacties die plaatsvinden in de mycosphere. De studie voegt twee belangrijke spelers in de mycosphere toe aan de eerder gevonden mycosphere bewoners als *Burkholderia terrae* en *Dyella japonica*. Hetzelfde geldt voor de gevonden mechanismen: die sluiten aan bij het eerder gevonden mechanisme van bepaalde type secretiesysteem, T3SS, dat een kritische factor is in het succes van het innemen van de mycosphere als habitat. De mogelijke rol van het gevonden plasmide in het ecologische succes van *Variovorax paradoxus* blijft vooralsnog onbekend.